

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Mediche Generali e dei Servizi**

Ciclo XXIX (2° Bando)

Settore Concorsuale di afferenza: 06/G1

Settore Scientifico disciplinare: MED/38

**ALLERGIA E SENSIBILIZZAZIONE AL GRANO IN ETÀ PE-
DIATRICA: VALUTAZIONE DEI DIVERSI PROFILI MOLE-
COLARI E CROSS-REATTIVITÀ CON I POLLINI.**

Presentata da: Dott.ssa Elisabetta Calamelli

Coordinatore Dottorato

Prof. Luigi Bolondi

Relatore

Prof. Giampaolo Ricci

Esame finale anno 2017

Indice

Introduzione	pag. 3
<i>Definizione e classificazione dell'allergia al grano</i>	3
<i>Epidemiologia dell'allergia al grano</i>	5
<i>Gli allergeni del grano</i>	6
<i>Cross-reattività tra allergeni del grano e allergeni pollinici</i>	10
<i>Diagnosi dell'allergia al grano</i>	12
 Materiali e metodi	 14
<i>Obiettivi dello studio</i>	15
<i>Popolazione e disegno dello studio</i>	16
<i>Analisi Statistica</i>	17
 Risultati	 18
<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	18
<i>Esiti del test di provocazione orale</i>	19
<i>Confronto tra i pazienti "Allergici al grano" e "Tolleranti al grano"</i>	21
<i>Analisi delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic)</i>	22
 Discussione	 28
 Bibliografia	 32

INTRODUZIONE

Definizione e classificazione dell'allergia al grano

Il grano (*Triticum aestivum*) rappresenta una componente fondamentale della dieta Mediterranea e i prodotti a base di grano sono ampiamente consumati in tutto il mondo. Tuttavia, negli ultimi anni, si è assistito a un incremento della prevalenza delle patologie legate all'assunzione di questo alimento [1].

Lo spettro dei disordini correlati all'assunzione di grano comprende i disturbi a patogenesi autoimmune (malattia celiaca, dermatite erpetiforme e atassia da glutine), allergica (allergia al grano) e non allergica/non autoimmune (sensibilità al glutine non celiaca) [1, 2].

L'allergia al grano comprende pertanto patologie a patogenesi sia IgE sia non IgE-mediate che si verificano dopo esposizione agli allergeni del grano (**Fig.1**). Le reazioni allergiche al grano sono caratterizzate da una risposta di ipersensibilità mediata dai linfociti T helper di tipo 2 (Th2) con conseguente espressione di citochine del pattern Th2-specifico (es. interleuchina (IL)-4, l'IL-13 e l'IL-5) [2]. Nel caso di reazione IgE-mediate l'infiammazione Th2 stimola i linfociti di tipo B a produrre anticorpi IgE-specifici verso gli allergeni del grano, mentre nel caso di reazioni non IgE-mediate si verifica un'infiammazione cronica cellulomediata caratterizzata dalla presenza di cellule T ed eosinofili [2]. L'allergia al grano IgE-mediate comprende pertanto tutte le reazioni di

ipersensibilità immediata (di tipo I) che si verificano dopo ingestione (orticaria/angioedema, anafilassi, anafilassi grano-dipendente indotta dall'esercizio) o inalazione (asma/rinite occupazionale, es. asma del panettiere) di allergeni del grano [1, 2].

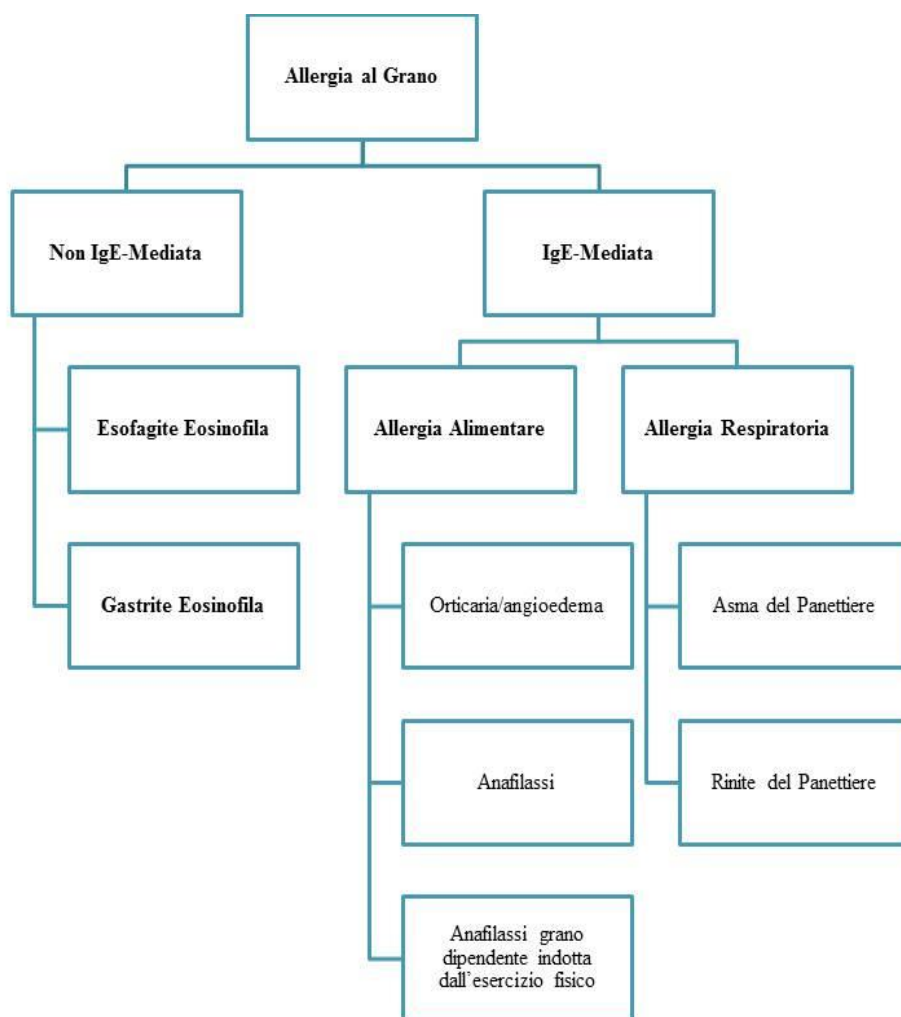


Figura 1 . Classificazione dell'allergia al grano. Modificata da A Cianferoni. [2]

Epidemiologia dell'allergia al grano

La prevalenza di sensibilizzazione al grano e delle reazioni avverse correlate cambia nella popolazione generale, a seconda delle diverse fasce di età e degli stili di vita. Come dimostrato da alcuni studi di coorte, la prevalenza della sensibilizzazione al grano è di circa il 4% nei bambini in età prescolare [3] e aumenta progressivamente con l'età (dal 2 al 9% dai 2 ai 10 anni di vita) per il fenomeno di cross-sensibilizzazione con i pollini [4]. Al contrario, l'allergia alimentare al grano insorge tipicamente nei primi anni di vita con una prevalenza fino all'8% dei bambini di età ≤ 3 anni e, nella maggior parte dei casi, scompare tra i 3 e i 5 anni di età [5], riguardando solo il 2% della popolazione in età adolescenziale e adulta [6-9]. Un recente studio su una popolazione thailandese ha mostrato come il 69% di bambini allergici al grano all'età di nove anni ha già raggiunto uno stato di tolleranza [10]. Tuttavia la reale prevalenza dell'allergia al grano confermata dal test di provocazione orale (TPO) è tuttora sconosciuta [2]. L'asma del panettiere invece rappresenta una delle principali allergie occupazionali e colpisce dall'1 al 10% dei fornai, con una maggiore prevalenza nel sesso maschile [11-14]. Infine, l'anafilassi grano-dipendente indotta dall'esercizio si verifica più frequentemente negli adolescenti e giovani adulti dopo l'ingestione di alimenti a base di grano e seguente esercizio fisico [5, 15].

Gli allergeni del grano

Il grano appartiene alla famiglia delle graminacee (*Poaceae*) e il chicco è composto dal 10-15% di proteine, che costituiscono la fonte allergenica [16].

Agli inizi dello scorso secolo, Osborne ha classificato le proteine del grano in frazioni distinte, a seconda della loro solubilità nei diversi solventi:

1. Le albumine, solubili in acqua; 2. Le globuline solubili in soluzioni saline deboli; 3. Le gliadine solubili in soluzioni idroalcoliche e; 4. Le glutenine solubili in soluzioni diluite di acidi o di alcali [16].

Le albumine e le globuline sono proteine a funzione strutturale ed enzimi metabolicamente attivi. Le gliadine e le glutenine invece sono proteine di deposito dei semi e rappresentano l'85% delle proteine del grano e costituiscono la frazione del glutine, che consente alla farina di grano di essere panificata [17].

L'avvento della diagnostica allergologica basata su allergeni molecolari (la cosiddetta "*component-resolved diagnosis*") ha permesso una migliore caratterizzazione delle diverse componenti allergeniche del grano e, in parte, ha spiegato meglio i fenomeni di cross-reattività con i pollini.

Fino ad ora sono stati caratterizzati più di 20 allergeni del grano [18], tra questi 11 sono stati definiti come allergeni maggiori [2], (**Tab 1**).

La classificazione degli allergeni del grano è illustrata nella **Fig. 2**. [19].

Gli inibitori dell'alfa amilasi/tripsina (Tri a 28 e Tri a 29.01) sono allergeni a basso peso molecolare (12-16 kDa) e sono tra i più comuni aller-

geni implicati nell'asma del panettiere, nell'anafilassi e nell'anafilassi grano dipendente indotta dall'esercizio fisico [2]. Questi allergeni sono resistenti al calore e non cross-reagiscono con gli allergeni presenti nei pollini di graminacee. Anche Tri a14 [non specific Lipid Transfer Protein (nsLTP)] e Tri a19 (ω -5 gliadina) sono allergeni termostabili e sono implicati sia nelle reazioni immediate dopo ingestione di grano, sia nell'asma del panettiere (in particolare Tri a14) e nell'anafilassi da esercizio fisico [20-22]. Recentemente Tri a 14 è stato segnalato in alcuni case report come responsabile di reazioni IgE-mediate in soggetti celiaci [23]. Un altro allergene rilevante è Tri a 37, una proteina di difesa delle piante, anch'essa resistente al calore e alla digestione enzimatica implicata in reazioni avverse dopo ingestione [2]. Infine, la profilina Tri a 12 del grano sembra essere prevalentemente coinvolta nel meccanismo di cross-sensibilizzazione con la profilina Phl p 12 dei pollini di graminacee [18].

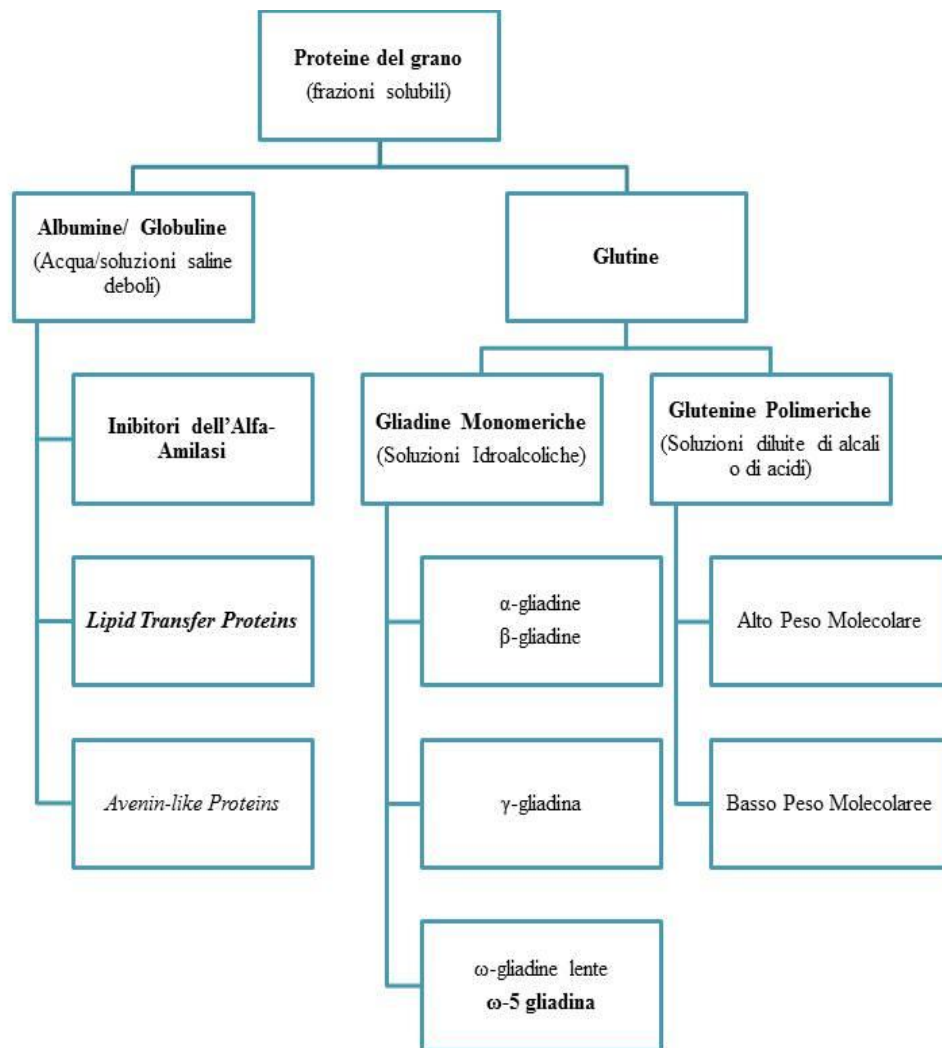


Figura 2 . Classificazione degli allergeni del grano in base alla frazione di solubilità . Modificato da MJ Mäkelä e coll. [19].

Tabella 1. Allergeni molecolari del grano. Gli allergeni maggiori sono evidenziati in grassetto. Modificato da www.allergen.org [18] e A. Cianferoni [2].
Abbreviazioni: LTP: Lipid Transfer Protein, PM: Peso Molecolare

Nome Allergene	Nome Biochimico	Peso Molecolare (kDa)
Tri a 12	Profilina	14
Tri a 14	Non-specific LTP 1	9
Tri a 15	Inibitore α -amilasi monomerico	
Tri a 18	Agglutinina isolectina 1	
Tri a 19	ω-5 gliadina	65
Tri a 20	γ - gliadina	35-38
Tri a 21	α - β gliadina	
Tri a 25	Tioredoxina	25
Tri a 26	Glutenina ad alto PM	88
Tri a 27	Omologo tiol-reduttasi	27
Tri a 28	α-amilasi inibitore dimerico	13
Tri a 29	α-amilasi inibitore tetramerico	13
Tri a 30	α -amilasi inibitore tetramerico	16
Tri a 31	Trioso fosfato Isomerasi	
Tri a 32	Perossiredoxina	
Tri a 33	Serpina	
Tri a 34	Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	
Tri a 35	Deidrina	
Tri a 36	Glutenina a basso PM	40
Tri a 37	α -purotionina	12
Tri a 39	Inibitore serin proteasi-like	

Cross-reattività tra grano e allergeni pollinici

E' dimostrata l'esistenza di un fenomeno di cross-reattività tra i pollini e gli alimenti di origine vegetale dovuto alla presenza di allergeni comuni definiti pan-allergeni. Questo fenomeno riguarda anche gli allergeni del grano: infatti grano e graminacee appartengono entrambi alla famiglia delle *Poaceae* e svariati allergeni del grano cross-reagiscono con quelli dei pollini. La presenza di cross-reattività tra grano e pollini di graminacee è stata dimostrata anche clinicamente in diversi studi: circa il 65% dei pazienti pollinosici è infatti sensibilizzato al grano, mentre fino al 40% degli allergici al grano mostra IgE specifiche verso i pollini di graminacee [24]. Questi dati sono stati confermati anche da studi di coorti di nascita: nel 2008 lo studio MAS (Multi-Centre Allergy study) ha riportato un aumento di prevalenza con l'aumentare dell'età della sensibilizzazione al grano in una coorte di bambini tedeschi seguiti dalla nascita e questo fenomeno è stato spiegato come secondario alla sensibilizzazione ai pollini che avviene in età scolare [4]. Più recentemente, lo studio Inglese FAIR (Food Allergy and Intolerance Research) condotto sulla coorte di nascita dell'Isola di Wight ha documentato che fino al 40% di bambini sensibilizzati ai pollini di graminacee ha anche IgE specifiche per il grano [25].

Infine l'analisi dei dati preliminari dello studio Italiano "Panallergeni in Pediatria" (PAN-PED)- Follow-up 2015" ha mostrato che su 75 pazienti

pollinosici in età pediatrica arruolati presso il Centro di Allergologia Pediatrica dell'Università di Bologna la sensibilizzazione al grano era dell'1.4% e cresceva fino al 5.6% alla visita di follow-up a 5 anni [26] mentre la prevalenza di reazioni clinicamente rilevanti dopo assunzione di grano nella stessa popolazione era solamente dell'1.3% [26].

Diagnosi di allergia al grano

La diagnosi dell'allergia IgE-mediata al grano, così come la diagnosi di tutte le allergie alimentari, si basa su un'anamnesi suggestiva di reazione avversa di tipo immediato (entro 1-3 ore) dopo assunzione di grano e concomitante conferma di presenza di IgE specifiche per il grano documenta tramite test cutanei a lettura immediata (Skin-Prick Test (SPT) e/o test *in vitro* (dosaggio di IgE specifiche per il grano su siero) [2]. Nonostante la diagnostica allergologica costituisca uno strumento rilevante per il clinico [19], il gold standard per effettuare una diagnosi di certezza o di esclusione dell'allergia alimentare al grano è il test di provocazione orale (TPO) che, come noto, non è sempre di facile esecuzione in età pediatrica e può esitare anche in reazioni gravi e potenzialmente fatali, come l'anafilassi [27].

Gli studi condotti fino ad ora in età pediatrica hanno cercato di identificare valori di cut-off predittivi di reazione avversa al TPO, con lo scopo di discriminare quei pazienti a maggior rischio di sviluppare reazioni avverse rispetto a quelli che hanno raggiunto uno stato di tolleranza spontaneamente. I valori di cut-off identificati dai diversi studi sono riportati in **Tab. 2** [2, 19, 21, 28-30]. Come si evince dalla tabella nessuno studio fino ad ora ha identificato valori con specificità sensibilità tali da poter sostituire il TPO come gold standard diagnostico [2].

Tabella 2. Valori di cut-off per IgE specifiche predittivi di allergia alimentare al grano [19, 21, 28-30]. Modificato da A. Cianferoni [2].

Abbreviazioni: DP= Decision Point; SPT= Skin Prick Test.

Valori cut-off	Popolazione	Sensibilità (%)	Specificità (%)	PPV (%)	NPV (%)
SPT positivo per Grano					
	40 bambini con diagnosi confermata con TPO (aperto o doppio cieco) [21]	89	71	74	88
Livello di IgE specifiche per Grano					
>0.36 kU/L	40 bambini con diagnosi confermata da TPO (aperto o doppio cieco) [21]	95	67	72	93
>0.36 kU/L	30 bambini con diagnosi confermata da TPO [19]	-	-	58	97
=10.1 kU/L	173 bambini con diagnosi confermata con TPO o storia di recente anafilassi [29]	61	74	75	60
=26 kU/L (90% DP)	23 bambini con diagnosi confermata con TPO doppio cieco [30]	61	92	74	87
= 70 kU/L (95% DP)	32 bambini con diagnosi confermata con TPO o storia di recente anafilassi [28]	62	97	95	71
=100 kU/L (95% DP)	23 bambini con diagnosi confermata con TPO doppio cieco [30]	13	100	100	76
Livello di IgE specifiche per ω-5 gliadina					
= 0.41 kU/L	173 bambini con diagnosi confermata con TPO o storia di recente anafilassi [29]	72	79	81	69
1.3 kU/L (95% DP)	32 bambini con diagnosi confermata con TPO o storia di recente anafilassi [28]	44	97	93	62

MATERIALI E METODI

Obiettivi dello studio

Gli **obiettivi principali** del presente studio sono pertanto i seguenti:

- ✓ Identificare la presenza di diversi profili di IgE specifiche (IgEs) verso una specifica componente molecolare del grano in pazienti con allergia al grano, rispetto ai pazienti con sola sensibilizzazione.
- ✓ Determinare l'accuratezza diagnostica delle due componenti allergeniche principali del grano (Tri a 14 e Tri a 19) nel predire la positività del TPO al grano .

Gli **obiettivi secondari** sono invece i seguenti:

- ✓ Identificare la prevalenza di sensibilizzazione ai pollini di graminacee in pazienti con sensibilizzazione/allergia al grano.
- ✓ Identificare la prevalenza di sensibilizzazione ad altri cereali (riso, orzo, avena, mais) nei pazienti con sensibilizzazione/allergia al grano.

Popolazione e Disegno dello studio

In questo studio osservazionale, monocentrico, trasversale, esplorativo sono stati arruolati in modo consecutivo soggetti di razza caucasica con riscontro di livelli di IgE specifiche per il grano ≥ 1 kU/L (età compresa tra 3 mesi e 17 anni) già seguiti nell'ambito del normale percorso assistenziale presso l'Ambulatorio di Allergologia Pediatrica (U.O. di Pediatria – Prof. Pession) del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna. Sono stati esclusi i soggetti con malattia celiaca. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Indipendente dell'AOU di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi [Prot. WheatAllergy (n°194/2013/O/OssN)].

La gestione del paziente è avvenuta nell'ambito del normale percorso assistenziale attraverso:

- Visita di arruolamento allo studio: verifica dei criteri di inclusione/esclusione, presentazione dello studio ai genitori o rappresentanti legali del bambino, consegna del foglio informativo, firma del consenso informato;
- Valutazione clinica del soggetto con raccolta dell'anamnesi e storia clinica del paziente (familiarità per atopia, anamnesi positiva per patologia atopica quale dermatite atopica, asma, rino-congiuntivite allergica, sintomatologia clinica dopo assunzione di grano o altri alimenti);

- Esecuzione dello Skin Prick Test (Lofarma, Milano, Italia) per estratti allergenici (pollini di graminacee, parietaria, betulla, cipresso, olivo, nocciolo e grano, riso, orzo, avena, mais);
- Prelievo di campione ematico per la determinazione nel siero di IgE specifiche (ImmunoCap 1000 Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) per gli estratti allergenici sopracitati , il glutine e per gli allergeni molecolari [rPhl p 1, rPhl p 5, rPhl p 12 (profilina), rTri a 14, r Tri a 19];
- Nei pazienti con diagnosi di allergia al grano per i quali si è delineata la necessità di una conferma diagnostica è stato effettuato un TPO nell'ambito del normale percorso assistenziale.

I soggetti sono stati successivamente suddivisi in 2 gruppi: “Allergici al grano “ e “Tolleranti al grano”. Il gruppo “Tolleranti al grano” comprendeva i soggetti con sensibilizzazione al grano ma senza manifestazioni cliniche correlate alla sua assunzione . Il gruppo “Allergici al grano” comprendeva i soggetti con manifestazioni cliniche di tipo IgE-mediato dopo assunzione di grano.

Analisi statistica

La differenza tra i diversi profili di sensibilizzazione verso i diversi allergeni e verso le specifiche componenti molecolari del grano nei pazienti con allergia al grano, rispetto ai pazienti tolleranti è stata valutata tramite il test del chi-quadrato e le differenze tra i livelli di media geometrica delle IgE specifiche (IgEs) tramite il test di Mann-Whitney. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

Sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) per allergia al grano sono stati calcolati per i livelli di IgEs per grano, glutine, Tri 14 e Tri a 19. L'accuratezza diagnostica dei livelli di IgEs verso il grano, il glutine e verso le componenti molecolari del grano (Tri a 14 e Tri a 19) nel predire l'esito del TPO orale è stata valutata tramite l'analisi delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic).

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate tramite MedCalc statistical software (Versione 12.5.0, MedCalc Software, Ostend, Belgium).

RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti

Sono stati arruolati consecutivamente presso l'Ambulatorio di Allergologia Pediatrica dell'Università di Bologna 21 pazienti caucasici (M/F:16/5; età media 7.9 anni) con sensibilizzazione al grano. Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione inclusa sono descritte nella **Tab. 3**.

Tabella 3. Caratteristiche cliniche e demografiche dei 21 soggetti inclusi nello studio sensibilizzati al grano e suddivisi in due gruppi ("Tolleranti al grano" e "Allergici al grano"). °Confronto tra "Allergici" e "Tolleranti".

Caratteristiche dei Pazienti	Totali	Allergici al Grano	Tolleranti al Grano	p-value
Numero totale	21	6 (28.6%)	15 (71.4%)	-
Sesso, M/F	16/5	5/1	11/4	NS
Età media (aa)	7.9	6.0	8.8	
Patologia atopica				
- Asma	6 (28.6%)	2 (33.3%)	4 (26.6%)	NS
- Rinocongintivite	9 (42.9%)	2 (33.3%)	7 (46.6%)	NS
- Pollinosi	10 (47.6%)	2 (33.3%)	8 (53.3%)	NS
- Altra allergia Alimentare pregressa o in atto	17 (80.9%)	4 (66.6%)	13 (86.6%)	NS
- Uovo	11 (52.4%)	3 (50%)	8 (53.3%)	NS
- Latte	7 (33.3%)	2 (33.3%)	5 (33.3%)	NS
- Pesce	1 (4.7%)	0	1 (4%)	NS
- Frutta secca	6 (28.6%)	3 (50%)	3 (20%)	NS
- Altro cereale	3 (14.2%)	1 (16.6%)	2 (13.3%)	NS
- Dermatite atopica	14 (66.7%)	5 (83%)	9 (60%)	NS

Esiti del Test di Provocazione Orale

La diagnosi di allergia al grano è stata confermata in 6 pazienti (28%), tra i quali 3 (50%) presentavano anche un quadro di pollinosi da graminacee. Tutti i soggetti presentavano sintomi da ingestione, mentre una paziente manifestava anche sintomi da contatto e inalazione. Tre pazienti (50%) hanno presentato un quadro di anafilassi. I quadri clinici e i rispettivi profili di sensibilizzazione dei pazienti allergici al grano sono descritti in **Tab.4**.

Tabella 4. Profilo di sensibilizzazione e sintomi di allergia al grano nei soggetti positivi al TPO o con storia di reazione avversa severa.

Caratteristiche Paziente		Livello di IgE specifiche (kU/L)			
Età (anni)	Sintomi	Grano	Glutine	Tri a 14	Tri a 19
				(LTP)	(ω-5 gliadina)
4.5	Anafilassi	26,7	21,9	0,58	2,1
14.0	Anafilassi	100	100	21,3	8,4
1.5	Orticaria/angioedema	21,8	26,1	0,14	1,66
14.5	Anafilassi Asma del Panettiere Orticaria da contatto	100	100	70	1,13
0.8	Orticaria/angioedema	9,25	7,05	0,01	0,01
0.6	Orticaria/angioedema	3,82	4,91	0,01	1,84

Confronto tra i pazienti “Allergici al grano” e “Tolleranti al grano”

I diversi profili di IgEs e SPT verso gli allergeni testati sono riportati in **Tab.5**. La presenza di sensibilizzazione per Tri a 14 è stata riscontrata nella maggior parte dei pazienti arruolati (11/21; 52.3%), mentre verso Tri a 19 solo in 5/21 (23.8%).

Il confronto tra i diversi profili di sensibilizzazione verso gli allergeni del grano ha mostrato, all'interno del gruppo “Allergici al grano”, una maggiore prevalenza di sensibilizzazione per il glutine (100% vs. 46.6%; $p < .05$) e verso Tri a 19 rispetto al gruppo dei soggetti tolleranti (83% vs. 0%, $p < .05$), mentre la prevalenza di sensibilizzazione verso Tri a 14 (50% vs. 53.3%) non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi. I livelli di IgEs (media geometrica) invece verso il grano e glutine sono risultati superiori nei pazienti allergici rispetto a quelli tolleranti (rispettivamente 24.3 vs 8.2 kU/L e 24.4 vs. 6.9 kU/L; $p < .05$). Anche la prevalenza di positività dello SPT per l'estratto allergenico di grano è risultata superiore tra i pazienti allergici (5/6; 83.3%) rispetto al gruppo dei soggetti tolleranti (3/15; 20%; $p < .05$).

La prevalenza di sensibilizzazione verso i pollini di graminacee (*Phleum p.*) è risultata pari al 71.4% della popolazione studiata con una prevalenza inferiore nei soggetti allergici al grano (3/6; 50%) vs. l' 80% dei soggetti tolleranti (NS). Come atteso, la prevalenza di sensibilizzazione per il pan-

allergene cross-reattivo profilina (Phl p 12) è risultata prevalente tra i soggetti tolleranti (7/15; 46.6%) rispetto a quelli allergici (1/6; 16.6%).

Infine lo studio della sensibilizzazione verso altri cereali (riso, orzo, avena e granoturco) ha mostrato una maggiore prevalenza di sensibilizzazione verso orzo (100% vs. 66.6%; NS), avena (83.3% vs. 66.6%; NS) e granoturco (83.3% vs. 53.3%; NS) nella popolazione degli allergici al grano. Questo gruppo presentava inoltre livelli di IgEs per questi tre cereali più elevati rispetto al gruppo dei tolleranti (IgEs per orzo: 10,4 vs. 3,9 kU/L; $p < .05$; IgEs per avena 4,6 kU/L vs. 1,4 kU/L; $p < .05$; IgEs per granoturco 3,3 kU/L vs. 0,9; $p < .05$) . Al contrario la prevalenza di sensibilizzazione al riso è risultata maggiore tra il gruppo dei tolleranti (86.6% vs. 50%; NS) mentre livelli di IgEs per questo allergene sono risultati simili nei diversi gruppi.

Tabella 5. Profilo di sensibilizzazione verso gli allergeni del grano, gli allergeni pollinici e gli altri cereali in una popolazione di 21 bambini con sensibilizzazione al grano suddivisi in due gruppi “Allergici al grano” e “Tolleranti al grano”.

Abbreviazioni: IgEs= IgE specifiche; media g= media geometrica; N/A= non applicabile; NS= non significativo.

	Totali (n=21)	Allergici al Grano (n=6)	Tolleranti al Grano (n=15)	p-value°
IgEs Grano, media g	11,4	24,3	8,2	<.05
- n°positivi	21 (100%)	6 (100%)	15 (100%)	NS
IgEs Glutine, media g	11,8	24,4	6,9	<.05
- n°positivi	13 (62%)	6 (100%)	7 (46.6%)	<.05
IgEs Tri a 14, media g	2,3	3,3	1,9	<.05
- n°positivi	11 (52.3%)	3 (50%)	8 (53.3%)	NS
IgEs Tri a 19, media g	2,3	2.2	-	N/A
- n°positivi	5 (23.8)	5 (83.3%)	0	<.05
IgEs Phleum p., media g	18,9	5,1	15,2	NS
- n°positivi	15 (71.4%)	3 (50%)	12 (80%)	NS
IgE s Phl p 12, media g	5,7	1,81	6,7	NS
- n°positivi	8 (38%)	1 (16.6%)	7 (46.6%)	NS
SPT Grano (media Ø ponfo, mm)	4.5	4.8	4	NS
- n°positivi	8 (38%)	5 (83.3%)	3 (20%)	<.05
IgEs Riso, media g	3,4	4,5	3,2	NS
- n°positivi	16 (76%)	3 (50%)	13 (86,6%)	NS
IgEs Orzo, media g	5,7	10,4	3,9	<.05
- n°positivi	16 (76%)	6 (100%)	10 (66.6%)	NS
IgEs Avena, media g	2,1	4,6	1,4	<.05
- n°positivi	15 (71.4%)	5 (83.3%)	10 (66.6%)	NS
IgEs Granoturco, media g	1,5	3,3	0,9	<.05
- n°positivi	13 (62%)	5 (83.3%)	8 (53.3%)	NS

° confronto tra i due gruppi “Allergici al grano” e “Tolleranti al grano”

Analisi delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic)

Considerando un valore di cut-off per livelli di IgEs ≥ 0.35 kU/L, la componente molecolare Tri a 19 ha mostrato la migliore sensibilità (83.3%) e specificità (100%) nella diagnosi allergia al grano con elevato VPP e VPN (100% e 92,8% rispettivamente), mentre la performance diagnostica di Tri a 14 è risultata scarsa (sensibilità 50%, specificità 53,8%, VPP 33,8% e VPN 70%). L'area della curva ROC (AUC) per IgEs per Tri a 19 è risultata 0.917 per un valore di cut-off di 0.34 kU/L, mentre l'AUC per sIgE verso grano e glutine erano 0,763 e 0,798 per un valore di cut-off rispettivamente di 14,9 kU/L e 18,2 kU /L (**Fig. 3-4-5**). L'AUC per le IgEs verso Tri a 14 non è risultato rilevante.

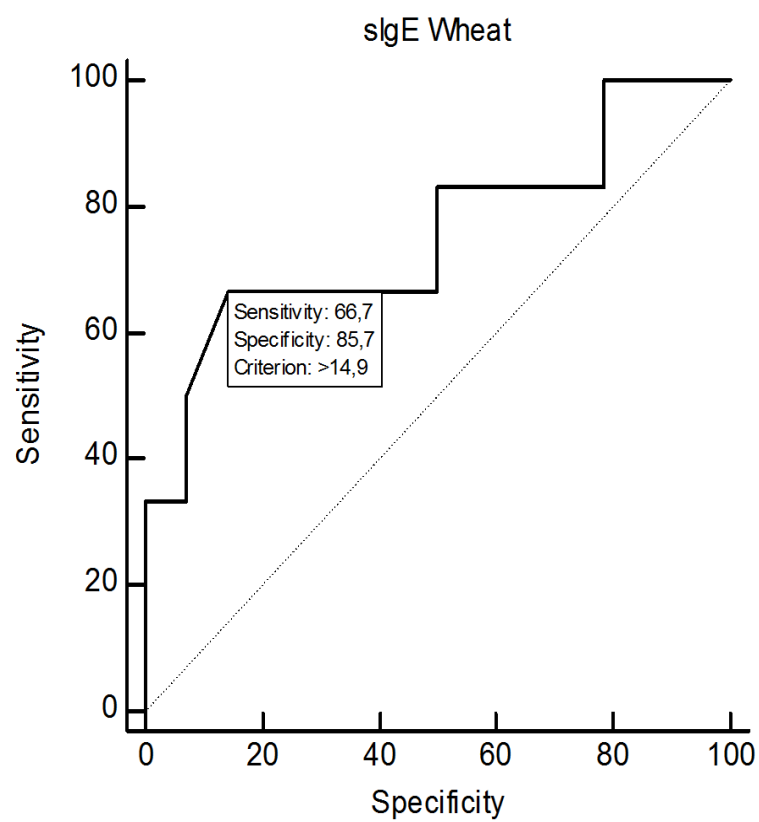


Figura 3. Analisi delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare l'accuratezza diagnostica dei livelli di IgE specifiche verso il grano nel predire reazioni avverse al test di provocazione orale con il grano.

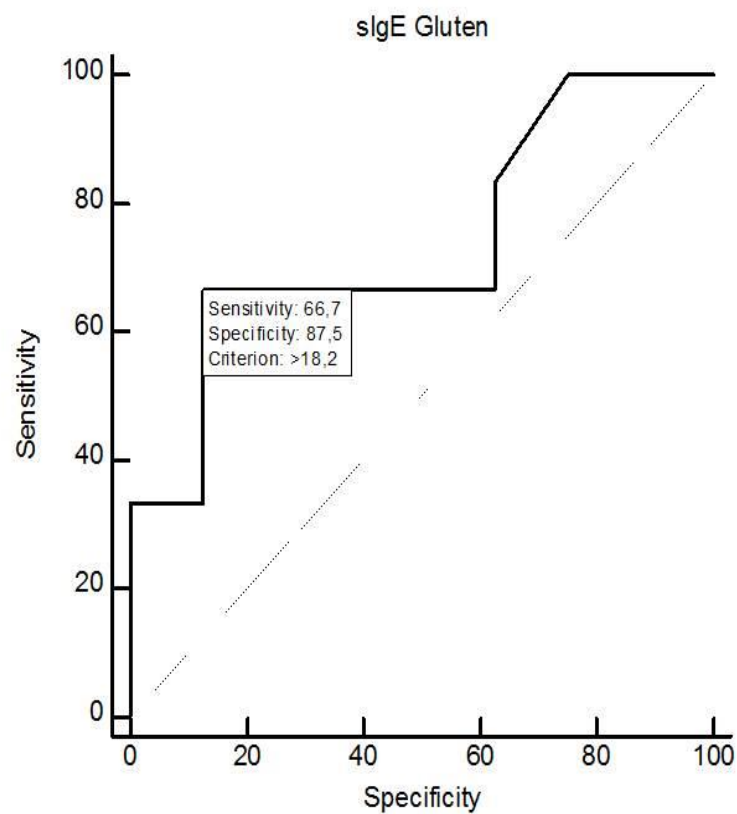


Figura 4. Analisi delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare l'accuratezza diagnostica dei livelli di IgE specifiche verso il glutine nel predire reazioni avverse al test di provocazione orale con il grano.

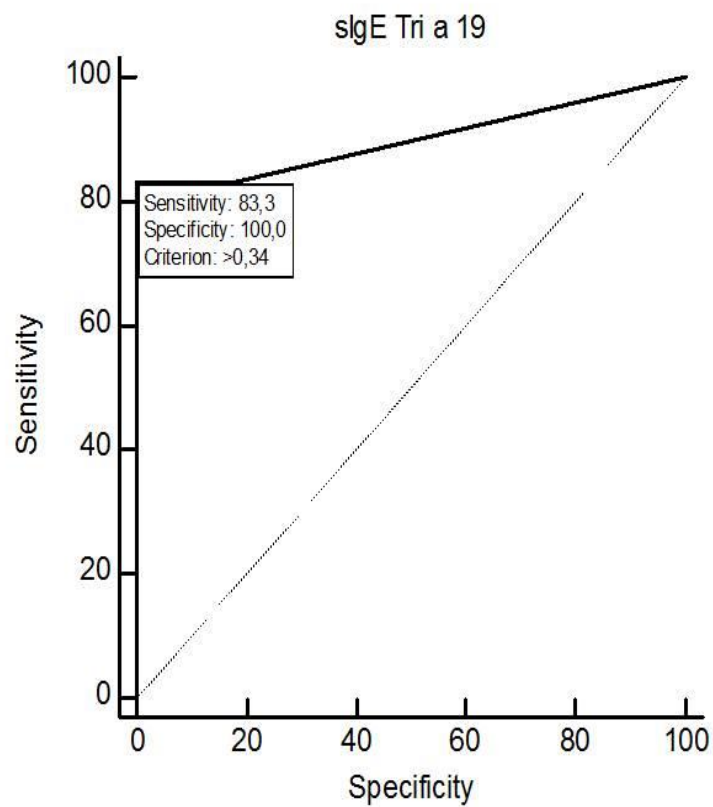


Figura 5. Analisi delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare l'accuratezza diagnostica dei livelli di IgE specifiche verso l'omega-5 gliadina (Tri a 19) nel predire reazioni avverse al test di provocazione orale con il grano.

DISCUSSIONE

Questo è il primo studio che analizza l'accuratezza della diagnostica molecolare nel predire la risposta al TPO in una popolazione pediatrica con allergia/sensibilizzazione al grano in Italia. L'analisi riportata completa e implementa quella dei dati preliminari già oggetto di pubblicazione [31, 32].

Precedenti studi condotti in altri paesi hanno studiato i diversi profili molecolari di IgEs nei pazienti allergici grano e hanno valutato il ruolo delle componenti allergeniche del grano come strumento diagnostico sia in età pediatrica che nelle epoche successive. Il presente studio ha mostrato risultati comparabili a quelli presentati da Nilsson e coll. [28] e Palosuo e coll. [21] su popolazioni del Nord-Europa (Svezia e Finlandia) riguardanti il ruolo rilevante dell'allergene del grano ω -5 gliadina (Tri a 19) come strumento diagnostico per predire l'esito del TPO. I nostri dati pertanto confermano quelli di questi studi precedenti, anche in pazienti provenienti da un'area geografica differente (area del Mediterraneo - Italia).

In contrasto con i nostri risultati, Battais e coll. hanno riscontrato una minore prevalenza di sensibilizzazione verso entrambi gli allergeni Tri a 14 e Tri a 19 (rispettivamente del 28% e 37% vs. 50% e 83.3% della nostra popolazione) in un gruppo di bambini e adulti Francesi con allergia alimentare al grano [20]. Inoltre anche uno studio più recente condotto da Nam e coll. ha mostrato una bassissima prevalenza di sensibilizzazione verso la LTP del grano Tri a 14 (4.8%) in una popolazione di adulti

Coreani allergici al grano, mentre la prevalenza di sensibilizzazione per Tri a 19 (70%) è risultata paragonabile alla nostra popolazione [33]. Sempre in contrasto con i nostri risultati, l'analisi di due studi sull'allergia al grano in età pediatrica [34], uno condotto su popolazione statunitense e l'altro su bambini tedeschi, non ha evidenziato nessuna correlazione tra sensibilizzazione a Tri a 19 e positività al TPO per il grano. Le discrepanze con i nostri risultati, in particolare riguardo alla prevalenza di sensibilizzazione verso la LTP del grano Tri a 14, può essere spiegata dalla differenza nelle aree geografiche dove sono stati condotti i diversi studi [35]. Infatti la cosiddetta "LTP syndrome", tipica delle popolazioni residenti nell'area del Mediterraneo, è fortemente influenzata dall'area geografica di appartenenza e dipende dai differenti patterns di esposizione ai pollini e dalle diverse abitudini alimentari [36].

Come mostrato da studi precedenti, le LTP contenute in diversi semi e frutti (ad esempio Ara h 9 nelle arachidi o Pru p 3 nelle pesche), sono allergeni rilevanti in pazienti allergici che vivono nelle regioni meridionali dell' Europa (area del Mediterraneo) e sono coinvolti in reazioni allergiche da moderate a gravi, soprattutto a causa della loro stabilità alle alte temperature e alla proteolisi gastrica [28]. Tuttavia, nonostante il ruolo della LTP del grano Tri a 14 sia stato documentato come allergene professionale nell'asma del panettiere, pochi dati sono tuttora disponibili sulla sua rilevanza clinica come allergene alimentare in pazienti con allergia al grano. Nonostante la prevalenza di sensibilizzazione verso Tri a 14 sia risultata rilevante nella nostra popolazione (52.3%), questo allergene non

si è rilevato tuttavia utile nel predire l'esito del TPO confermando il ruolo controverso di questa molecola come allergene alimentare.

Infine lo studio della cross-reattività tra pollini di graminacee e grano ha mostrato come la prevalenza di sensibilizzazione verso i pollini di graminacee (*Phleum p.*) sia rilevante tra i sensibilizzati al grano (pari al 71.4% della popolazione studiata) con una prevalenza dell' 80% tra i soggetti senza allergia alimentare clinicamente significativa. Inoltre, come atteso, la prevalenza di sensibilizzazione per il pan-allergene cross-reattivo delle graminacee profilina (Phl p 12) è risultata prevalente tra i soggetti solo sensibilizzati al grano (7/15; 46.6%) rispetto a quelli allergici (1/6; 16.6%). Questi dati confermano quelli del recente studio inglese FAIR condotto sulla coorte di nascita dell'Isola di Wight che ha documentato che fino al 40% di bambini sensibilizzati ai pollini di graminacee è co-sensibilizzato anche per il grano [25]. Il riscontro quindi di sensibilizzazione al grano senza sintomatologia clinica correlata è verosimilmente riconducibile al fenomeno di cross-reattività tra allergeni di origine vegetale appartenenti alla stessa famiglia (*Poaceae*) e può essere pertanto spiegato come un meccanismo di sensibilizzazione secondaria ai pollini di graminacee e non come una sensibilizzazione primaria al grano stesso [4].

In conclusione, i risultati del presente studio mostrano come solo il 28.6% dei pazienti sensibilizzati al grano presenti reazioni cliniche rilevanti e che nella maggior parte dei soggetti la sensibilizzazione grano è dovuta alla cross-sensibilizzazione con i pollini di graminacee. Inoltre questi dati

confermano l'importanza dell'allergene molecolare del grano Tri a 19 (ω -5 gliadina) come strumento predittivo di reazione avversa nella popolazione pediatrica, utile per monitorare l'eventuale tolleranza nel follow-up dei bambini allergici grano. E' necessaria tuttavia una popolazione di dimensioni più ampie per confermare questi dati .

BIBLIOGRAFIA

1. A. Sapone, J.C. Bai, C. Ciacci, J. Dolinsek, P.H. Green, M. Hadji-vassiliou, K. Kaukinen, K. Rostami, D.S. Sanders, M. Schumann, R. Ullrich, D. Villalta, U. Volta, C. Catassi, A. Fasano. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 2012;10:13.
2. A. Cianferoni . Wheat allergy: diagnosis and management. *Journal of Asthma and Allergy.* 2016;9; 13-25
3. E. Ostblom, G. Lilja, S. Ahlstedt, M. van Hage, M. Wickman. Patterns of quantitative food-specific IgE-antibodies and reported food hypersensitivity in 4-year-old children. *Allergy.* 2008;63:418-24.
4. P.M. Matricardi, A. Bockelbrink, K. Beyer, T. Keil, B. Niggemann, C. Grüber, U. Wahn, Lau S. Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi-Centre Allergy Study cohort. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:493-500.
5. N. Inomata. Wheat allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9:238-43.
6. S.A. Bock. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics.* 1987;79:683-8.
7. S.A. Bock, H.A. Sampson. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am.* 1994 ;41:1047-67.

8. J.J. Jansen, A.F. Kardinaal, G. Huijbers, B.J. Vlieg-Boerstra, B.P. Martens, T. Ockhuizen. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;93:446-56.
9. H. A. Sampson. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:717-28.
10. N. Siripipattanamongkol, P. Vichyanond, O. Jirapongsananuruk, J. Veskitul, N. Visitsunthorn, P. Pacharn. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2016 (online version); PMID: 27543738.
11. X . Baur, P.O. Degens, I. Sander. Baker's asthma: still among the most frequent occupational respiratory disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Dec;102(6 Pt 1):984-97.
12. J. Ameille, G. Pauli, A. Calastreng-Crinquand, D. Vervloët, Y. Iwatsubo, E. Popin, M.C. Bayeux-Dunglas, M.C. Kopferschmitt-Kubler . Reported incidence of occupational asthma in France, 1996-99: the ONAP programme. *Observatoire National des Asthmes Professionnels. Occup Environ Med.* 2003;60:136-41.
13. H.L. Leira, U. Bratt, S. Slåstad. Notified cases of occupational asthma in Norway: exposure and consequences for health and income. *Am J Ind Med.* 2005;48:359-64.
14. J.L. Malo, M. Chan-Yeung. Agents causing occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:545-50.
15. E. Morita, K. Kunie, H. Matsuo. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci.* 2007;47:109-17.

16. T. Osborne. The proteins of the wheat kernel, Washington DC: Carnegie Inst. 1907, 84.
17. G. Pingitore. Il bambino allergico al grano. RIAP 2008;1: 3-7.
18. www.allergen.org; ultimo accesso 1 Febbraio 2017.
19. M.J. Mäkelä, C. Eriksson, A Kotaniemi-Syrjänen, et al. Wheat allergy in children - new tools for diagnostics. Clin Exp Allergy 2014; 44: 1420-30.
20. F. Battais, C. Richard, S. Jacquenet, S. Denery-Papini, D.A. Moneret-Vautrin. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. Eur Ann Allergy Clin Immunol. 2008;40:67-76. PMID: 19334370.
21. K. Palosuo, E. Varjonen, O.M. Kekki, T. Klemola, N. Kalkkinen, H. Alenius, T. Reunala. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. J Allergy Clin Immunol. 2001;108:634-8.
22. M. Egger, M. Hauser, A. Mari, F. Ferreira, G. Gadermaier. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. Curr Allergy Asthma Rep. 2010;10:326-35. doi: 10.1007/s11882-010-0128-9.
23. M.F. Martin-Munoz, D. Rivero, A. Diaz Perales, I Polanco, S. Quince. Wheat allergy in celiac children. Pediatr Allergy Immunol. 2016; 27: 102-105.

24. C. Constantin, S. Quirce, M. Pooralshar, A. Touraev, B. Niggemann, A. Mari, C. Ebner, H. Akerström, E. Heberle-Bors, M. Nystrand, R. Valenta. Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis. *Allergy* 2009;64:1030-37.
25. C. Venter, K. Maslin, S.H. Arshad, V. Patil, J. Grundy, G. Glasbey, R. Twiselton, T. Dean. *Clin Transl Allergy* 2016; 6:22.
26. A. Corbelli. “Evoluzione clinica della rinite allergica in età pediatrica: cosensibilizzazioni e comorbidità. Dati preliminari”. Tesi di laurea in Medicina e Chirurgia, Università di Bologna. AA 2015/2016.
27. A. Cianferoni, K. Khullar, R. Saltzman, J. Fiedler, J.P. Garrett, Naimi DR, Spergel JM. Oral food challenge to wheat: a near-fatal anaphylaxis and review of 93 food challenges in children. *World Allergy Organ J* 2013; 6(1): 14.
28. N. Nilsson, S. Sjölander, A. Baar, M. Berthold, S. Pahr, S. Vrtala, R. Valenta, E. Morita, G. Hedlin, M.P. Borres, C. Nilsson. Wheat allergy in children evaluated with challenge and IgE antibodies to wheat components. *Pediatr Allergy Immunol* 2015; 26: 119-25.
29. M. Ebisawa, R. Shibata, S. Sato, M.P. Borres, K. Ito. Clinical utility of IgE antibodies to omega-5 gliadin in the diagnosis of wheat allergy: a pediatric multicentre challenge³ study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158(1): 71-76.

30. H.A. Sampson. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5): 891-896.
31. E. Calamelli, G. Ricci and A. Pession. Evaluation of IgE sensitization profiles in a pediatric population with wheat allergy. *Austin J Allergy* 2014; 1: 4.
32. E. Calamelli, G. Ricci. Wheat allergy in a pediatric population from the Mediterranean area. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015; 26(7): 681-2.
33. Y.H. Nam, E.K. Hwang, H.J Jin, J.M. Lee, Y.S. Shin, Y.M. Ye, A. Palacin, G. Salcedo, S.Y. Lee, H.S. Park. Comparison of specific IgE antibodies to wheat component allergens in two phenotypes of wheat allergy. *J Korean Med Sci.* 2013; 28: 1697-9.
34. K. Beyer, D. Chung, G. Schulz, M. Mishoe, B. Niggemann, U. Wahn, H.A. Sampson. The role of wheat omega-5 gliadin IgE antibodies as a diagnostic tool for wheat allergy in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122: 419-421.
35. E.A. Pastorello, L. Farioli, A. Conti, V. Pravettoni, S. Bonomi, S. Iametti, D. Fortunato, J. Scibilia, C. Bindslev-Jensen, B. Ballmer-Weber, A.M. Robino, C. Ortolani. Wheat IgE-Mediated Food Allergy in European Patients: α -Amylase Inhibitors, Lipid Transfer Proteins and Low-Molecular-Weight Glutenins. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 144: 10-22.
36. E. Scala, S.J. Till, R. Asero, D. Abeni, E.C. Guerra, L. Pirotta, R. Paganelli, D. Pomponi, M. Giani, O. De Pittà, L. Cecchi. Lipid Transfer Protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk

assessment in an Italian cohort. Allergy 2015: Apr 22. doi:
10.1111/all.12635.